



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117836014 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 05

(21) 申请号 202280057420.6

伯德·库恩 穆林静

(22) 申请日 2022.09.01

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

(30) 优先权数据

公司 11021

21194695.9 2021.09.03 EP

专利代理师 柳春琦 李新红

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2024.02.22

A61K 51/04 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 31/496 (2006.01)

PCT/EP2022/074263 2022.09.01

C07B 59/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C07D 405/12 (2006.01)

W02023/031311 EN 2023.03.09

C07D 405/14 (2006.01)

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

C07D 409/14 (2006.01)

地址 瑞士巴塞尔

G01N 33/60 (2006.01)

申请人 苏黎世联邦理工学院

A61P 25/00 (2006.01)

(72) 发明人 卢卡·克劳迪奥·戈比

A61K 101/00 (2006.01)

乌韦·迈克尔·格莱瑟 何颖芳

A61K 101/02 (2006.01)

权利要求书2页 说明书14页 附图3页

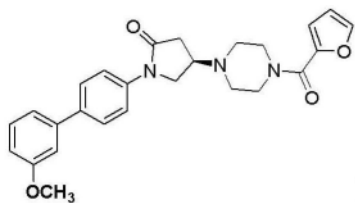
(54) 发明名称

MAGL抑制剂

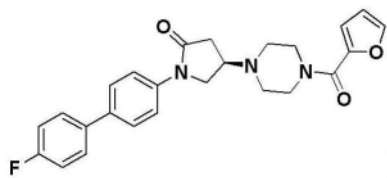
(57) 摘要

本发明提供了新的可逆单酰基甘油脂肪酶(MAGL)抑制剂,其治疗或预防与MAGL相关的疾病或病情有用。根据本发明的所述可逆MAGL抑制剂还可以用放射性同位素来标记并因此对医学成像诸如正电子发射断层扫描(PET)和/或放射自显影有用。

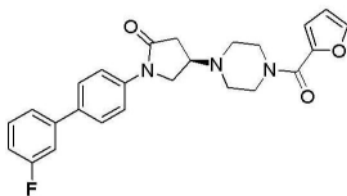
1. 一种化合物,其选自由以下项组成的组:



I; 以及



II;

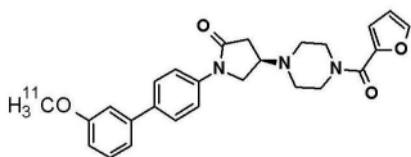


III

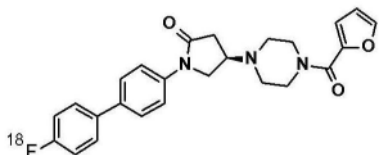
或其药用盐,其中所述化合物任选地包含放射性标记。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述放射性标记选自 ^{11}C 和 ^{18}F 。

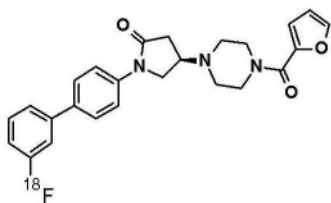
3. 根据权利要求2所述的化合物,其选自由以下项组成的组:



[^{11}C]-I; 以及



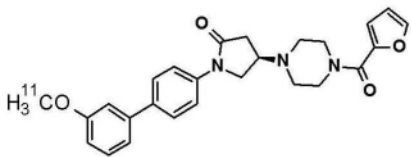
[^{18}F]-II;



[^{18}F]-III

或其药用盐。

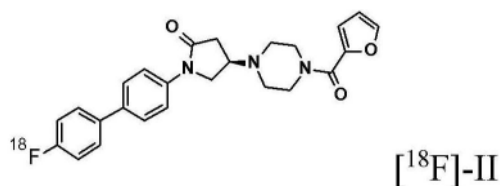
4. 根据权利要求2所述的化合物,其为



[^{11}C]-I

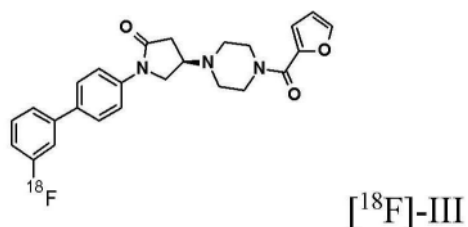
或其药用盐。

5. 根据权利要求2所述的化合物, 其为



或其药用盐。

6. 根据权利要求2所述的化合物, 其为



或其药用盐。

7. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求1至6中任一项所述的化合物, 或其药用盐, 以及药用赋形剂。

8. 根据权利要求1所述的化合物, 其用作治疗活性物质。

9. 一种对哺乳动物的脑中的单酰基甘油脂肪酶 (MAGL) 进行诊断成像的方法, 所述方法包括:

(a) 向所述哺乳动物施用可检测量的经放射性标记的根据权利要求1至6中任一项所述的化合物, 或其药用盐, 或根据权利要求7所述的药物组合物; 以及

(b) 检测与MAGL缔合时候的经放射性标记的化合物。

10. 经放射性标记的根据权利要求1至6中任一项所述的化合物, 或其药用盐, 或根据权利要求7所述的药物组合物, 其用于单酰基甘油脂肪酶 (MAGL) 占有率研究。

11. 经放射性标记的根据权利要求1至6中任一项所述的化合物, 或其药用盐, 或根据权利要求7所述的药物组合物, 其用于根据权利要求9所述的方法中。

12. 经放射性标记的根据权利要求1至6中任一项所述的化合物, 或其药用盐, 或根据权利要求7所述的药物组合物在根据权利要求9所述的方法中的用途。

13. 经放射性标记的根据权利要求1至6中任一项所述的化合物, 或其药用盐用于制备药物的用途, 所述药物用于对哺乳动物的脑中的单酰基甘油脂肪酶 (MAGL) 进行诊断成像。

14. 根据权利要求1所述的化合物, 其用于治疗或预防神经炎症、神经退行性疾病、疼痛、癌症、精神障碍、多发性硬化症、阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、创伤性脑损伤、神经毒性、卒中、癫痫、焦虑症、偏头痛、抑郁症、炎症性肠病、腹痛、与肠易激综合征相关的腹痛和/或内脏痛。

15. 如前所述的本发明。

MAGL抑制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及对哺乳动物中的治疗或预防有用的有机化合物,并且特别涉及用于治疗或预防哺乳动物中与MAGL相关的疾病或病情的单酰基甘油脂肪酶(MAGL)抑制剂。本发明进一步涉及对医学成像诸如正电子发射断层扫描(PET)和/或放射自显影有用的经放射性标记的MAGL抑制剂。

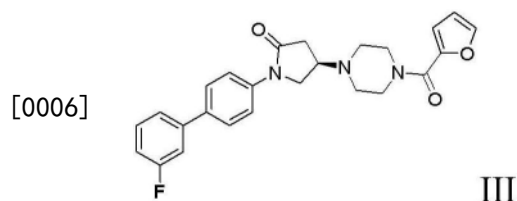
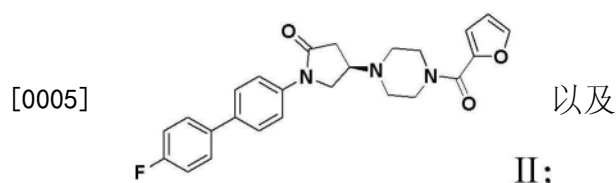
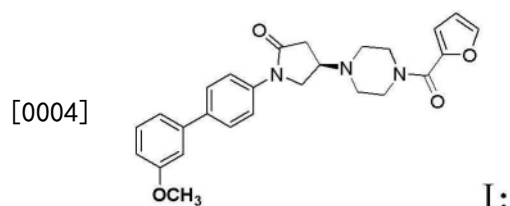
背景技术

[0002] 单酰基甘油脂肪酶(MAGL)是一种丝氨酸水解酶,在中枢神经系统(CNS)以及若干个外周器官中高度表达(Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H, Holm C. cDNA Cloning, Tissue Distribution, and Identification of the Catalytic Triad of Monoglyceride Lipase. *J Biol Chem*. 1997; 272: 27218-27223; Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM 等人. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99: 10819-10824)。它在生理和病理条件下在内源性大麻素和脂质水平的调节中发挥着重要作用(Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. A Comprehensive Profile of Brain Enzymes that Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *Chem Biol*. 2007; 14: 1347-1356)。因此, MAGL抑制剂引起了极大的关注,并成为治疗多种疾病(包括神经退行性疾病、精神障碍和癌症)的潜在治疗药物(Gil-Ordóñez A, Martín-Fontecha M, Ortega-Gutiérrez S, López-Rodríguez ML. Monoacylglycerol lipase (MAGL) as a promising therapeutic target. *Biochem Pharmacol*. 2018; 157: 18-32)。正电子发射断层扫描(PET)作为一种非侵入性成像技术,通过提供有关药物-靶标接合、获取药物占有率和监测治疗的宝贵信息来支持药物发现和开发(Hou L, Rong J, Haider A 等人. Positron Emission Tomography Imaging of the Endocannabinoid System: Opportunities and Challenges in Radiotracer Development. 2020; 6)。早期开发的MAGL放射性配体主要是不可逆的配体,诸如 ^{11}C MA-PB (Ahamed M, Attili B, van Veghel D 等人. Synthesis and preclinical evaluation of ^{11}C MA-PB-1 for in vivo imaging of brain monoacylglycerol lipase (MAGL). *Eur J Med Chem*. 2017; 136: 104-113)、 ^{11}C SAR127303 (Wang L, Mori W, Cheng R 等人. Synthesis and Preclinical Evaluation of Sulfonamido-based ^{11}C -Carbonyl]-Carbamates and Ureas for Imaging Monoacylglycerol Lipase. *Theranostics*. 2016; 6: 1145-1159)、 ^{11}C PF-06809247 (Zhang L, Butler CR, Maresca KP 等人. Identification and Development of an Irreversible Monoacylglycerol Lipase (MAGL) Positron Emission Tomography (PET) Radioligand with High Specificity. *J Med Chem*. 2019; 62: 8532-8543)和 ^{18}F PF-06795071 (Chen Z, Mori W, Fu H 等人. Design, Synthesis, and Evaluation of ^{18}F -Labeled Monoacylglycerol Lipase Inhibitors as Novel Positron Emission Tomography Probes. *J Med Chem*. 2019; 62: 8866-8872), 其在药代动力学建模中难以提供药物-靶标相互作用的全面量化(Hou L, Rong J, Haider A 等人. Positron Emission Tomography

Imaging of the Endocannabinoid System: Opportunities and Challenges in Radiotracer Development. J Med Chem. 2021; 64: 123-149)。[¹⁸F]T-401目前代表了作为可逆MAGL PET放射性示踪剂最具代表性的案例(Hattori Y, Aoyama K, Maeda J等人. Design, Synthesis, and Evaluation of (4R)-1-{3-[2-(¹⁸F)Fluoro-4-methylpyridin-3-yl]phenyl}-4-[4-(1,3-thiazol-2-ylcarbonyl)piperazin-1-yl]pyrrolidin-2-one ([¹⁸F]T-401) as a Novel Positron-Emission Tomography Imaging Agent for Monoacylglycerol Lipase. J Med Chem. 2019; 62: 2362-2375)。然而, [¹⁸F]T-401的脑摄取较低, 存在CNS穿透的放射性代谢物。这些特征阻碍了MAGL在脑中的可视化, 并使动力学建模中特定结合信号的量化变得复杂(Pike VW, PET radiotracers: crossing the blood-brain barrier and surviving metabolism. Trends Pharmacol Sci. 2009; 30: 431-440)。由于缺乏适当的可逆MAGL PET示踪剂, 迄今为止, 在临床前阶段中尚未报道有治疗干预的MAGL占有率或病理条件下的MAGL改变。总而言之, 仍然需要可逆PET示踪剂来验证治疗性MAGL抑制剂的靶标接合, 以及研究健康和疾病条件下的MAGL表达水平(Hou L, Rong J, Haider A等人. Positron Emission Tomography Imaging of the Endocannabinoid System: Opportunities and Challenges in Radiotracer Development. J Med Chem. 2021; 64: 123-149)。

发明内容

[0003] 在第一方面, 本发明提供了一种化合物, 其选自由以下项组成的组:



[0007] 或其药用盐, 其中所述化合物任选地包含放射性标记。

[0008] 在另一方面, 本发明提供了一种本文所述的化合物, 其用作治疗活性物质。

[0009] 在另一方面, 本发明提供了一种本文所述的化合物, 其用于治疗或预防与MAGL相关的疾病或病情。

[0010] 在另一方面, 本发明提供了一种经放射性标记的本文所述的化合物, 其用于单酰基甘油酯酶(MAGL)占有率研究。

[0011] 在另一方面, 本发明提供了一种经放射性标记的本文所述的化合物, 其用于对哺

乳动物的脑中的单酰基甘油脂肪酶 (MAGL) 进行诊断成像。

[0012] 在另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含本文所述的经放射性标记的化合物以及药用载体。

附图说明

[0013] 图1示出了从mouse.brain-map.org检索到的小鼠脑中 $[^{11}\text{C}]$ -I (Cx=皮层;Hp=海马体;Cb=小脑;St=纹状体;Th=丘脑)和MAGL mRNA表达的体外放射自显影图(实验:69015242)。

[0014] 图2示出了MAGL敲除(KO)和野生型(WT)小鼠脑中 $[^{11}\text{C}]$ -I从9.0至52.5分钟内平均的代表性PET图像。

[0015] 图3示出了MAGL KO和WT小鼠的全脑中 $[^{18}\text{F}]$ -II和 $[^{18}\text{F}]$ -III的时间活性曲线(TAC)。

[0016] 图4示出了 $[^{18}\text{F}]$ -II的受体占有率,对于每次注射,其均通过摩尔活性来计算并包含在饱和函数中。将 $\text{SUV}_{0\text{至}90\text{分钟}}$ 拟合为饱和函数,并将数据转换为受体占有率百分比。○表示 $[^{18}\text{F}]$ -II与PF-06795071;●仅表示 $[^{18}\text{F}]$ -II(基线)。

[0017] 图5示出了与人MAGL可逆地结合的化合物-II的X射线共晶结构。

具体实施方式

[0018] 定义

[0019] 结合本发明的特定方面、实施例或实例描述的特征、整数、特性、化合物、化学部分或基因应理解为适用于本文所述的任何其他方面、实施例或实例,除非与其不相容。本说明书(包括任何所附权利要求、摘要和附图)中所公开的所有特征和/或由此公开的任何方法或过程的所有步骤可以任何组合进行组合,除了这些特征和/或步骤中的至少一些互相排斥的组合之外。本发明不限于任何前述实施例的细节。本发明扩展到本说明书(包括任何所附权利要求、摘要和附图)中所公开的特征的任何新颖特征或任何新颖组合,或者扩展到由此公开的任何方法或过程的步骤的任何新颖步骤或任何新颖组合。

[0020] 术语“药用盐”是指保留游离碱或游离酸的生物效果和性质的那些盐,这些盐在生物学或其他方面不是不合需要的。这些盐用无机酸诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等(特别是盐酸)和有机酸诸如乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲基磺酸、乙基磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸、N-乙酰基半胱氨酸等形成。此外,这些盐可通过将无机碱或有机碱加入游离酸中来制备。衍生自无机碱的盐包括但不限于钠、钾、锂、铵、钙、镁盐等。衍生自有机碱的盐包括但不限于以下各项的盐:伯胺、仲胺和叔胺、取代胺(包括天然存在的取代胺)、环胺和碱性离子交换树脂(诸如异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、赖氨酸、精氨酸、N-乙基哌啶、哌啶、聚亚胺树脂等)。

[0021] 缩写“MAGL”是指单酰基甘油脂肪酶。术语“MAGL”和“单酰基甘油脂肪酶”在本文中可互换使用。

[0022] 术语“哺乳动物”包括人类、非人灵长类动物(诸如黑猩猩和其他猿类和猴类物种)、农场动物(诸如牛、马、绵羊、山羊和猪)、家畜(诸如兔、犬和猫)、实验室动物(包括啮齿

动物,诸如大鼠、小鼠和豚鼠)。在某些实施例中,哺乳动物是人。术语“哺乳动物”并不表示特定的年龄或性别。

[0023] 术语“放射性标记”和“放射性同位素”可以互换使用,并且是指对PET成像有用的放射形核素,诸如 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 和 ^{18}F 。

[0024] 术语“药用赋形剂”和“治疗惰性赋形剂”可互换使用,并且表示药物组合物中不具治疗活性并且对接受施用的受试者无毒的任何药用成分,诸如配制药物产品时使用的崩解剂、粘结剂、填料、溶剂、缓冲剂、张度剂、稳定剂、抗氧化剂、表面活性剂、载体、稀释剂或润滑剂。

[0025] 如本文所用的术语“治疗”包括:(1)抑制疾病的至少一种临床或亚临床症状的状态、病症或病情(例如,在维持治疗的情况下,阻止、减轻或延迟疾病的发展或其复发);和/或(2)缓解病情(即,使疾病的状态、病症或病情或者至少一种其临床或亚临床症状消退)。对待治疗患者的益处统计学上是显著的或者至少是患者或医生可察觉的。然而,应当理解,当向患者施用药物以治疗疾病时,结果可能并不总是有效的治疗。

[0026] 如本文所用的术语“防治”包括:预防或延迟状态、病症或病情的临床症状的出现,该状态、病症或病情在可能患有或易患该状态、病症或病情但尚未经历或显示该状态、病症或病情的临床或亚临床症状的哺乳动物中、尤其是在人类中发展。

[0027] 如本文所用,术语“神经炎症”涉及神经组织的急性和慢性炎症,该神经组织为神经系统的两个部分的主要组织成分;中枢神经系统(CNS)的脑和脊髓以及周围神经系统(PNS)的分支周围神经。慢性神经炎症与神经退行性疾病诸如阿尔茨海默病、帕金森病和多发性硬化症相关联。急性神经炎症通常在中枢神经系统受伤后立即发生,例如,由创伤性脑损伤(TBI)引起。

[0028] 如本文所用,术语“创伤性脑损伤”(“TBI”,也称为“颅内损伤”)涉及因外部机械力诸如快速加速或减速、冲击、冲击波或弹丸穿透而造成的脑损伤。

[0029] 如本文所用,术语“神经退行性疾病”涉及与神经元的结构或功能的进行性丧失(包括神经元死亡)相关的疾病。神经退行性疾病的实例包括但不限于多发性硬化症、阿尔茨海默病、帕金森病和肌萎缩性脊髓侧索硬化症。

[0030] 如本文所用,术语“精神障碍”(也称为精神病或精神疾病)涉及可能引起痛苦或生活能力差的行为或精神模式。此类特征可能是持续的、复发的或缓和的,也可能是单个事件。精神障碍的实例包括但不限于焦虑症和抑郁症。

[0031] 如本文所用,术语“疼痛”是指与实际或潜在的组织损伤相关联的不愉快的感觉和情感体验。疼痛的实例包括但不限于感受伤害性疼痛、慢性疼痛(包括特发性疼痛)、神经病性疼痛(包括化疗诱导的神经病变)、幻痛和精神性疼痛。疼痛的一个特定实例是神经病性疼痛,其由影响到涉及身体感觉的神经系统(即躯体感觉系统)的任何部分的损伤或疾病引起。在一个实施例中,“疼痛”是由于截肢或开胸手术引起的神经病性疼痛。在一个实施例中,“疼痛”是化疗诱导的神经病变。

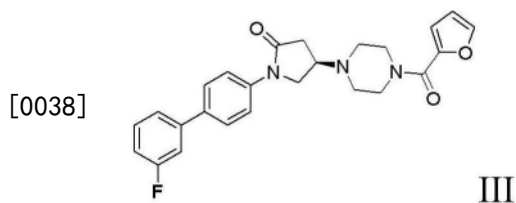
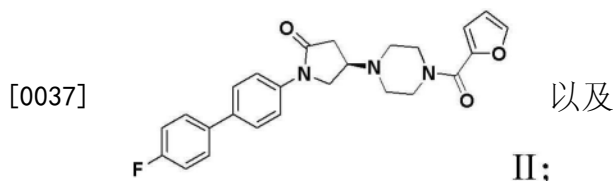
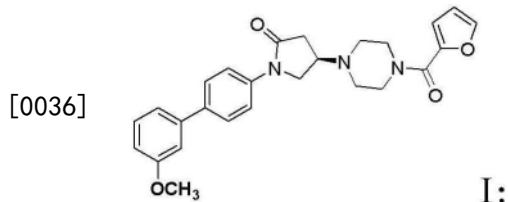
[0032] 如本文所用,术语“神经毒性”是指神经系统的毒性。这种情况发生于暴露于天然或人造有毒物质(神经毒素)时,这些物质改变神经系统的正常活动,从而对神经组织造成损伤。神经毒性的实例包括但不限于因暴露于化疗、放射治疗、药物治疗、药物滥用和器官移植中所用的物质以及暴露于重金属、某些食品和食品添加剂、农药、工业和/或清洁溶剂、

化妆品和一些天然物质而引起的神经毒性。

[0033] 如本文所用,术语“癌症”是指特征在于因异常失控的细胞(此类细胞为“癌细胞”)的生长而导致赘生物或肿瘤存在的疾病。如本文所用,术语癌症明确地包括但不限于肝细胞癌、结肠癌变和卵巢癌。

[0034] 本发明的化合物

[0035] 在一方面,本发明提供了一种化合物,其选自由以下项组成的组:

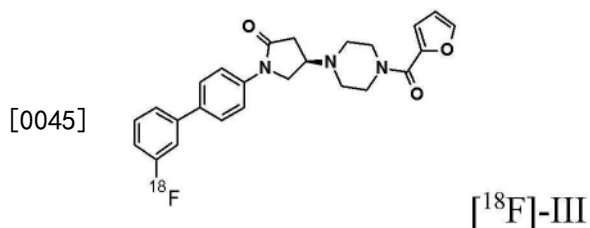
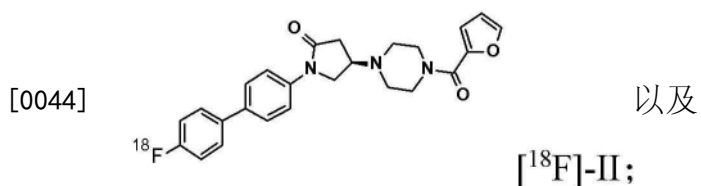
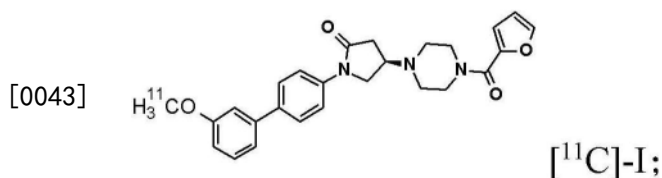


[0039] 或其药用盐,其中所述化合物任选地包含放射性标记。

[0040] 在一个实施例中,所述放射性标记选自 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 和 ^{18}F 。

[0041] 在优选的实施例中,所述放射性标记选自 ^{11}C 和 ^{18}F 。

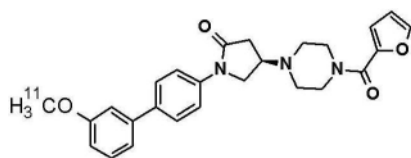
[0042] 在优选的实施例中,本发明提供了一种经放射性标记的化合物,其选自由以下项组成的组:



[0046] 或其药用盐。

[0047] 在一个实施例中,根据本发明的经放射性标记的化合物为

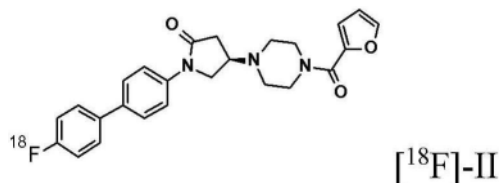
[0048]



[0049] 或其药用盐。

[0050] 在一个实施例中,根据本发明的经放射性标记的化合物为

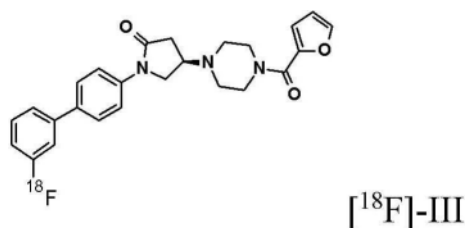
[0051]



[0052] 或其药用盐。

[0053] 在一个实施例中,根据本发明的经放射性标记的化合物为

[0054]



[0055] 或其药用盐。

[0056] 使用本发明的化合物

[0057] 本发明的化合物为强效的可逆MAGL抑制剂,可用于治疗或预防与MAGL相关的疾病或病情。可与MAGL相关的示例性疾病或病情为神经炎症、神经退行性疾病、疼痛、癌症、精神障碍、多发性硬化症、阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、创伤性脑损伤、神经毒性、卒中、癫痫、焦虑症、偏头痛、抑郁症、炎症性肠病、腹痛、与肠易激综合征相关的腹痛和/或内脏痛。

[0058] 因此,在一方面,本发明提供了一种治疗或预防哺乳动物中的神经炎症、神经退行性疾病、疼痛、癌症、精神障碍、多发性硬化症、阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、创伤性脑损伤、神经毒性、卒中、癫痫、焦虑症、偏头痛、抑郁症、炎症性肠病、腹痛、与肠易激综合征相关的腹痛和/或内脏痛的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用治疗活性量的式I、II或III的化合物或其药用盐。

[0059] 在另一方面,本发明提供了一种式I、II或III的化合物或其药用盐,其用于本文所述的治疗或预防的方法。

[0060] 在另一方面,本发明提供了式I、II或III的化合物或其药用盐在本文所述的治疗或预防的方法中的用途。

[0061] 在另一方面,本发明提供了式I、II或III的化合物或其药用盐用于制造药物的用途,该药物用于治疗或预防神经炎症、神经退行性疾病、疼痛、癌症、精神障碍、多发性硬化症、阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、创伤性脑损伤、神经毒性、卒中、癫痫、焦虑症、偏头痛、抑郁症、炎症性肠病、腹痛、与肠易激综合征相关的腹痛和/或内脏痛。

[0062] 本发明的化合物可以是经放射性标记的并用作例如非共价、可逆的PET示踪剂以验证治疗性MAGL抑制剂的靶标接合以及研究正常和疾病条件下的MAGL水平。

[0063] 因此,在一方面,本发明提供了一种对哺乳动物的脑中的单酰基甘油酯酶(MAGL)进行诊断成像的方法,该方法包括:

[0064] (a) 向哺乳动物施用可检测量的本文所述的经放射性标记的化合物、或包含本文所述的经放射性标记的化合物的药物组合物;以及

[0065] (b) 检测与MAGL缔合时候的经放射性标记的化合物。

[0066] 在另一方面,本发明提供了如本文所述的经放射性标记的化合物或其药用盐、或包含本文所述的经放射性标记的化合物的药物组合物,其用于单酰基甘油酯酶(MAGL)占有率研究。

[0067] 在一个实施例中,所述单酰基甘油酯酶(MAGL)占有率研究包括使MAGL与本文所公开的经放射性标记的化合物或其药用盐接触。

[0068] 在另一方面,本发明提供了如本文所述的经放射性标记的化合物或其药用盐、或包含本文所述的经放射性标记的化合物的药物组合物,其用于对哺乳动物的脑中的单酰基甘油酯酶(MAGL)进行诊断成像的方法中。

[0069] 在另一方面,本发明提供了如本文所述的经放射性标记的化合物或其药用盐、或包含本文所述的经放射性标记的化合物的药物组合物在对哺乳动物的脑中的单酰基甘油酯酶(MAGL)进行诊断成像的方法中的用途。

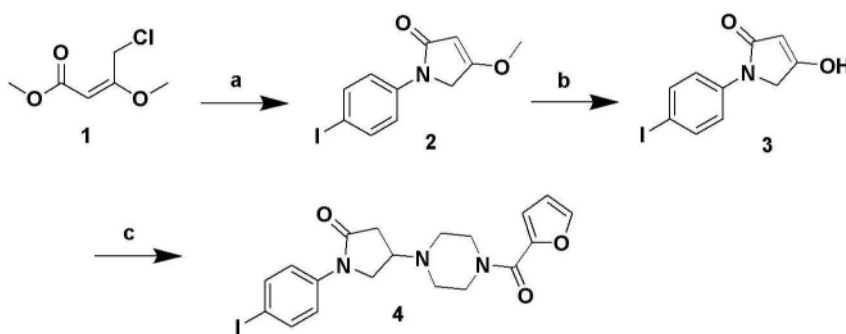
[0070] 在另一方面,本发明提供了如本文所述的经放射性标记的化合物或其药用盐用于制备药物的用途,该药物用于对哺乳动物的脑中的单酰基甘油酯酶(MAGL)进行诊断成像。

[0071] 在一个实施例中,所述诊断成像为正电子发射断层扫描(PET)。

[0072] 在一个实施例中,哺乳动物的脑中的单酰基甘油酯酶(MAGL)的所述诊断成像包括使单酰基甘油酯酶(MAGL)与本文所公开的经放射性标记的化合物或其药用盐接触。

[0073] 实例

[0074] 实例1-中间体1至4的合成



[0075]

[0076] 方案1. 中间体2至4的合成。a) 三乙胺, 四丁基碘化铵, 3-碘苯胺, CH_3CN /甲苯, 50°C , 过夜, 24%; b) 浓盐酸, CH_3CN , 50°C , 4至5小时, 85%; c) 氰基硼氢化钠, 呋喃-2-基(哌嗪-1-基)甲酮, 乙酸, 无水THF, 室温, 过夜, 49%。

[0077] 步骤a-1-(4-碘苯基)-4-甲氧基-1,5-二氢-2H-吡咯-2-酮(2)的合成。

[0078] 将化合物1 (4.12g, 25.0mmol)、4-碘苯胺 (4.00g, 18.3mmol)、四丁基碘化铵 (67.5mg, 0.18mmol) 和三乙胺 (2.80mL, 20.1mmol) 溶于乙腈 (15mL) 中。在冰浴中搅拌10分钟后, 将反应混合物在 50°C 加热14小时。将反应冷却至室温, 并加入1M HCl将pH调节至3。将所得混合物用水稀释并用乙酸乙酯进行萃取。将合并的有机层用盐水洗涤, 经 MgSO_4 干燥, 并

在减压下浓缩。向残余物中加入甲苯(10mL)和乙酸(1mL),并将混合物在50℃加热4小时。将反应浓缩,并将产物用甲醇/二异丙醚(1:1)进行结晶。用二异丙醚洗涤后,获得所需产物,其为白色粉末(1.46g,25%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ7.61(d,J=9.0Hz,2H),7.42(d,J=9.0Hz,2H),5.16(s,1H),4.21(s,2H),3.85(s,3H)。利用HRMS(ESI)计算C₁₁H₁₁INO₂⁺[M+H]⁺315.9829m/z,实测值315.9828m/z。

[0079] 步骤b-4-羟基-1-(4-碘苯基)-1,5-二氢-2H-吡咯-2-酮(3)的合成。

[0080] 将化合物2(1.30g,4.14mmol)溶于10mL乙腈和6mL浓HCl中。当通过LC-MS监测到消耗量为2时,在减压下去除溶剂。将所得残余物用水稀释并用乙酸乙酯进行萃取。将合并的有机层经MgSO₄干燥,并浓缩。将粗产物不经任何的进一步纯化而直接应用于下一步。

[0081] 步骤c-4-(4-(呋喃-2-羰基)哌嗪-1-基)-1-(4-碘苯基)吡咯烷-2-酮(4)的合成。

[0082] 将10mL无水THF中的化合物3(570mg,1.89mmol)和呋喃-2-基(哌嗪-1-基)甲酮(409mg,2.27mmol)在室温搅拌10分钟。然后逐滴加入乙酸(217μL,3.8mmol),随后逐滴加入氰基硼氢化钠(357mg,5.68mmol)。将反应混合物在氮气保护下在室温搅拌22小时。加入水以猝灭反应,并将所得混合物用EtOAc进行萃取,并经MgSO₄干燥。过滤后,在减压下去除溶剂。用EtOAc进行快速柱色谱法,得到标题化合物,其为白色粉末(523mg,59%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ7.65(d,J=8.9Hz,2H),7.47(s,1H),7.36(d,J=8.9Hz,2H),7.01(d,J=3.3Hz,1H),6.47(dd,J=3.3,1.7Hz,1H),3.91-3.72(m,6H),3.24(p,J=7.8Hz,1H),2.81-2.68(m,1H),2.67-2.50(m,5H)。利用HRMS(ESI)计算C₁₉H₂₁IN₃O₃⁺[M+H]⁺466.0622m/z,实测值466.0628m/z。

[0083] 实例2-(R)-4-(4-(呋喃-2-羰基)哌嗪-1-基)-1-(3'-甲氧基-[1,1'-联苯]-4-基)吡咯烷-2-酮(化合物(I))的合成。

[0084] 将(3-甲氧基苯基)硼酸(43.0mg,0.28mmol)、化合物4(120mg,0.26mmol)、碳酸铯(210mg,0.65mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0)(23.6mg,0.03mmol)和Sphos(21.2mg,0.05mmol)加入到双颈烧瓶中。然后关闭系统并充入氮气。将预先用氮气吹扫的5mL DMF加入到烧瓶中,并将所得混合物在85℃回流下加热过夜。在化合物4消耗后,将反应冷却至室温,过滤并浓缩。通过半制备型HPLC来纯化粗品,以得到所需产物,其为白色粉末(87mg,76%)。使用超临界流体色谱法(SFC)进行手性分离以分离出标题化合物。¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ7.62(s,4H),7.51(dd,J=1.8,0.8Hz,1H),7.39-7.32(m,1H),7.18-7.13(m,2H),7.11-7.08(m,1H),6.93-6.88(m,1H),6.53(dd,J=3.5,1.8Hz,1H),4.30(dd,J=11.1,5.1Hz,1H),4.26-4.05(m,5H),3.98-3.89(m,1H),3.87(s,3H),3.19-3.05(m,4H),2.98(d,J=7.3Hz,2H)。利用HRMS(ESI)计算C₂₆H₂₇N₃NaO₄⁺[M+Na]⁺468.1894m/z,实测值468.1894m/z。

[0085] 实例3-(R)-1-(3'-氟-[1,1'-联苯]-4-基)-4-(4-(呋喃-2-羰基)哌嗪-1-基)吡咯烷-2-酮(化合物(III))的合成。

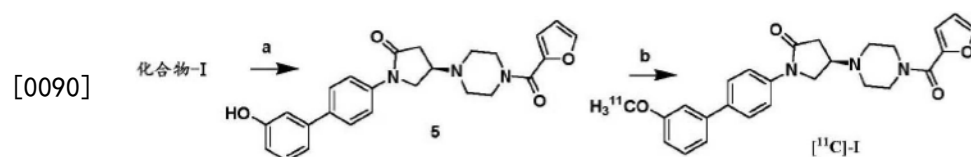
[0086] 在手性分离后,将描述的化合物(I)的合成程序应用于3-氟苯硼酸(57.9mg,0.41mmol)、化合物4(175mg,0.38mmol)、碳酸铯(307mg,0.94mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0)(34.5mg,0.04mmol)和Sphos(31mg,0.08mmol)以得到标题化合物,其为白色粉末。¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ7.66-7.62(m,2H),7.61-7.58(m,2H),7.52-7.50(m,1H),7.44-7.32(m,2H),7.28-7.23(m与氯仿-d重叠,1H),7.16(dd,J=3.6,0.9Hz,1H),7.08-7.01(m,1H),6.54(dd,J=3.5,1.8Hz,1H),4.36(dd,J=11.2,5.0Hz,1H),4.25-4.13(m,5H),4.08-3.97

(m, 1H), 3.31-3.10 (m, 4H), 3.06-3.00 (m, 2H)。利用HRMS (ESI) 计算 $C_{25}H_{24}FN_3NaO_3^+[M+Na]^+$ 456.1694m/z, 实测值456.1699m/z。

[0087] 实例4- (R)-1-(4'-氟-[1,1'-联苯]-4-基)-4-(4-(呋喃-2-羰基)哌嗪-1-基)吡咯烷-2-酮(化合物(II))的合成。

[0088] 在手性分离后,将描述的化合物(I)的合成程序应用于4-氟苯硼酸(33.1mg, 0.24mmol)、化合物4(100mg, 0.22mmol)、碳酸铯(175mg, 0.54mmol)、三(二亚苄基丙酮)二钯(0)(19.7mg, 0.02mmol)和Sphos(17.7mg, 0.04mmol)以得到标题化合物,其为白色粉末。 1H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 7.64(d, J=8.7Hz, 2H), 7.58(d, J=8.7Hz, 2H), 7.55-7.51(m, 3H), 7.17-7.12(m, 3H), 6.55(dd, J=3.5, 1.8Hz, 1H), 4.32(dd, J=11.0, 5.1Hz, 1H), 4.26-4.02(m, 5H), 3.96(p, J=7.3Hz, 1H), 3.14(br, 4H), 3.05-2.97(m, 2H)。利用HRMS (ESI) 计算 $C_{25}H_{25}FN_3O_3^+[M+H]^+$ 434.1874m/z, 实测值434.1875m/z。

[0089] 实例5- $[^{11}C]$ -I的合成



[0091] 方案2. 前体5和 $[^{11}C]$ -I的合成。a) BBr_3 , 无水DCM, 0°C, 过夜; b) $[^{11}C]CH_3I$, CS_2CO_3 , 5分钟, 无水DMF, 90°C。

[0092] 步骤a- (R)-4-(4-(呋喃-2-羰基)哌嗪-1-基)-1-(3'-羟基-[1,1'-联苯]-4-基)吡咯烷-2-酮(5)的合成。

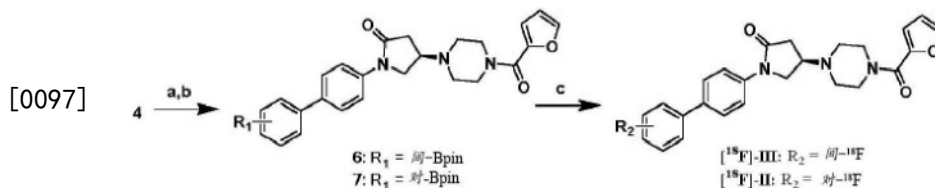
[0093] 在0°C,向化合物(I)(107mg, 0.241mmol)在5mL无水二氯甲烷中的溶液中逐滴加入二氯甲烷中的1M三溴化硼(1.90mL, 1.93mmol)。然后在试剂消耗后将反应混合物在室温搅拌。加入饱和 $NaHCO_3$ 溶液以猝灭反应,并将所得混合物用EtOAc进行萃取。将合并的有机相经 $MgSO_4$ 干燥,过滤,浓缩并通过快速柱色谱法(硅胶, EtOH/ $CHCl_3$ =1/35-1/20)来纯化。获得标题化合物,其为白色固体(54mg, 75%)。使用超临界流体色谱法(SFC)进行手性分离以分离出5,其为R-同种型。 1H NMR(400MHz, 丙酮- d_6) δ 7.83(d, J=8.8Hz, 2H), 7.71-7.68(m, 1H), 7.63(d, J=8.8Hz, 2H), 7.28(t, J=8.1Hz, 1H), 7.15-7.10(m, 2H), 6.97(dd, J=3.4, 0.7Hz, 1H), 6.83(ddd, J=8.1, 2.2, 1.0Hz, 1H), 6.58(dd, J=3.4, 1.8Hz, 1H), 4.11(dd, J=9.7, 7.4Hz, 1H), 3.89(dd, J=9.7, 6.6Hz, 1H), 3.80(br, 4H), 3.41-3.30(m, 1H), 2.76(dd, J=16.6, 8.1Hz, 1H), 2.70-2.55(m, 5H)。利用HRMS (ESI) 计算 $C_{25}H_{26}N_3O_4^+[M+H]^+$ 432.1918m/z, 实测值432.1920m/z。

[0094] 步骤b- (R)-4-(4-(呋喃-2-羰基)哌嗪-1-基)-1-(3'-(甲氧基- ^{11}C)-[1,1'-联苯]-4-基)吡咯烷-2-酮($[^{11}C]$ -I)的合成

[0095] $[^{11}C]CO_2$ 是通过使用Cyclone 18/9回旋加速器(18MeV; IBA, Belgium)轰击有0.5%氧气强化的氮气靶,经由 $^{14}N(p, a)^{11}C$ 核反应来产生的。然后通过经由镍催化剂还原 $[^{11}C]CO_2$ 来获得 $[^{11}C]CH_4$,并使用气相碘化生成 $[^{11}C]CH_3I$ 。将所得的 $[^{11}C]CH_3I$ 与5mg CS_2CO_3 和0.5mg苯酚前体(在无水DMF中1mg/mL, 0.5mL)一起鼓入反应瓶中。然后将混合物在90°C加热3分钟。用1.6mL水稀释后,将反应混合物上样至半制备型HPLC以进行纯化。将所收集的级分用8mL Milli-Q水稀释,通过预处理的C18轻型滤芯(Waters, WAT023501),并随后用5mL Milli-Q水洗涤。用0.5mL EtOH洗脱后,用磷酸盐-缓冲盐水(9.5mL, Gibco)配制最终的放射性配体,以

得到中和溶液。通过在分析型HPLC中与化合物(I)共注入来确认放射性示踪剂的身份,并且放射化学纯度大于99%。

[0096] 实例6- ^{18}F -II和 ^{18}F -III的合成



[0098] 图3. 前体6和7的合成, 以及 ^{18}F -II和 ^{18}F -III的放射性合成。a) 1,4-苯基二硼酸, 乙酸钾, [1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯, 无水DMF, 80℃, 4小时, 对于6, 1,3-双(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)苯; 对于7, 1,4-双(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)苯; b) 手性超临界流体色谱法分离; c) 6或7, $^{18}\text{F}\text{F}^-$, Kryptofix® 222, $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$, K_2CO_3 和 $\text{Cu}(\text{OTf})_2\text{Py}_4$, DMA/n-BuOH=2/1, 110℃, 10分钟。

[0099] 步骤a, b- (R)-4-(4-(呋喃-2-羰基)哌嗪-1-基)-1-(3'-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)-[1,1'-联苯]-4-基)吡咯烷-2-酮(6)的合成。

[0100] 在氮气保护下, 将[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(7.9mg, 0.011mmol)、乙酸钾(63.3mg, 0.84mmol)和1,3-双(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)苯(142mg, 0.43mmol)加入到双颈烧瓶中。将溶于5mL无水DMF中的化合物4(100mg, 0.22mmol)一次性加入到烧瓶中, 并随后将所得混合物在85℃加热。在化合物4消耗后, 加入水以猝灭反应。将混合物用EtOAc进行萃取, 并将合并的有机层经 MgSO_4 干燥, 过滤并浓缩。将残余物通过快速柱色谱法(硅胶, EtOAc)来纯化, 得到标题化合物, 其为棕色粉末(47mg, 41%)。使用超临界流体色谱法(SFC)进行手性分离以分离出6, 其为R-异构体: ^1H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 8.02(s, 1H), 7.78(d, $J=7.4\text{Hz}$, 1H), 7.70-7.60(m, 5FH), 7.50-7.41(m, 2H), 7.07-6.99(m, 1H), 6.54-6.43(m, 1H), 4.13-3.65(m, 6H), 3.29(p, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 2.79(dd, $J=16.7$, 8.0Hz, 1H), 2.72-2.40(m, 5H), 1.36(s, 12H)。利用HRMS(ESI)计算 $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{BN}_3\text{O}_5^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 542.2826m/z, 实测值542.2828m/z。

[0101] 步骤a, b- (R)-4-(4-(呋喃-2-羰基)哌嗪-1-基)-1-(4'-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)-[1,1'-联苯]-4-基)吡咯烷-2-酮(7)的合成。

[0102] 在氮气保护下, 将[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(10mg, 0.014mmol)、乙酸钾(82mg, 0.84mmol)和1,4-双(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)苯(185mg, 0.56mmol)加入到双颈烧瓶中。将溶于5mL无水DMF中的化合物4(130mg, 0.28mmol)一次性加入到烧瓶中, 并随后将所得混合物在85℃加热。在化合物4消耗后, 加入水以猝灭反应。将混合物用EtOAc进行萃取, 并将合并的有机层经 MgSO_4 干燥, 过滤并浓缩。将残余物通过快速柱色谱法(硅胶, EtOAc)来纯化, 得到标题化合物, 其为棕色粉末(148mg, 49%)。使用超临界流体色谱法(SFC)进行手性分离以分离出7, 其为R-异构体: ^1H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ 7.87(d, $J=7.8\text{Hz}$, 2H), 7.73-7.61(m, 4H), 7.59(d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 7.48(s, 1H), 7.03(d, $J=3.3\text{Hz}$, 1H), 6.49(dd, $J=3.3$, 1.7Hz, 1H), 4.04-3.94(m, 1H), 3.92-3.72(m, 5H), 3.30(p, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 2.80(dd, $J=16.7$, 8.1Hz, 1H), 2.73-2.54(m, 5H), 1.36(s, 12H)。利用HRMS(ESI)计算 $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{BN}_3\text{O}_5^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 542.2826m/z, 实测值542.2828m/z。

[0103] 步骤c- (R)-1-(3'-(氟- ^{18}F)-[1,1'-联苯]-4-基)-4-(4-(呋喃-2-羰基)哌嗪-1-

基)吡咯烷-2-酮([¹⁸F]-III)的合成

[0104] [¹⁸F]氟离子是通过轰击98%富集的¹⁸O-水经由¹⁸O(p,n)¹⁸F核反应来产生的。将水溶液从回旋加速器转移至热室并捕获在QMA滤芯(Waters SepPak Accell QMA碳酸滤芯)上。将kryptofix 2.2.2(6.3mg/mL)、K₂C₂O₄(1mg/mL)和K₂CO₃(0.1mg/mL)在MeCN/H₂O(4:1)中的混合物应用于洗脱反应瓶的放射性。在与MeCN(0.8mL×3)共沸干燥后,将溶于DMA/n-BuOH(0.3mL,v/v=2/1)中的2至3mg前体6与14mg Cu(OTf)₂(py)₄加入到残余物中,并用通风针将反应混合物在110℃加热10分钟。用2.7mL水稀释后,对混合物进行半制备型HPLC纯化。使用与上述相同的程序收集、浓缩、洗脱和中和标题化合物。

[0105] 步骤c-(R)-1-(4'-(氟-¹⁸F)-[1,1'-联苯]-4-基)-4-(4-(呋喃-2-羰基)哌嗪-1-基)吡咯烷-2-酮([¹⁸F]-II)的合成

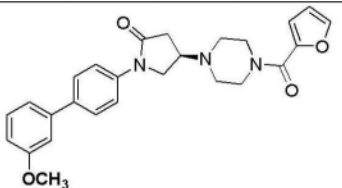
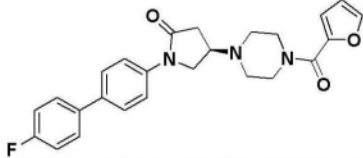
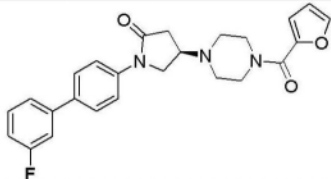
[0106] 使用2至3mg前体7,通过与([¹⁸F]-III)相同的程序来合成标题化合物。通过在分析型HPLC中共注入对应的化合物来验证其身份,其中放射化学纯度大于99%。

[0107] 实例7-MAGL抑制活性

[0108] 通过在天然底物2-花生四烯酰甘油水解得到花生四烯酸后测定酶促活性,分析化合物对MAGL的抑制活性,然后可进行质谱分析。该测定在后文缩写为“2-AG测定”。

[0109] 2-AG测定在384孔测定板(PP, Greiner目录号784201)中进行,总体积为20μL。在聚丙烯板中,利用3倍稀释步骤在100%DMSO(VWR Chemicals 23500.297)中制备化合物稀释液,以使测定的最终浓度范围为12.5μM至0.8pM。将0.25μL化合物稀释液(100%DMSO)加入到测定缓冲液(50mM TRIS(GIBCO,15567-027)、1mM EDTA(Fluka,03690-100ml)、0.01%(v/v)Tween)中的9μL MAGL中。振摇后,将板在RT下孵育15分钟。加入10μL 2-花生四烯酰甘油的测定缓冲液溶液,以开始反应。该测定中的最终浓度为50pM MAGL和8μM 2-花生四烯酰甘油。振摇并在RT下孵育30分钟后,加入40μL含4μM d8-花生四烯酸的乙腈淬灭反应。利用在线SPE系统(Agilent Rapidfire)与三重四极杆质谱仪(Agilent 6460)联用系统跟踪花生四烯酸的含量。在乙腈/水液体位置中,使用C18SPE小柱(G9205A)。质谱仪在负电喷雾模式下操作,花生四烯酸的质量离子对为303.1→259.1,d8-花生四烯酸的质量离子对为311.1→267.0。基于[花生四烯酸/d8-花生四烯酸]的强度比计算化合物的活性。

[0110] 表1

化合物	结构	IC ₅₀ (小鼠, nM)	IC ₅₀ (人, nM)
I		4.3	6.5
II		8.8	20.0
III		11.3	11.5

[0112] 实例8-体外放射自显影

[0113] 将Wistar大鼠或小鼠的冷冻脑组织在低温恒温器 (Cryo-Star HM 560MV; Microm, Thermo Scientific, Wilmington, DE) 上切成10μm的厚度, 并在使用前储存在-20℃。实验前, 将切片在冰上解冻10分钟, 并随后浸入含有3%无脂肪酸的牛血清白蛋白 (BSA) 的50mM Tris缓冲液 (pH 7.4, 30mM HEPES, 1.2mM MgCl₂, 110mM NaCl, 5mM KCl, 2.5mM CaCl₂) 中, 在0℃预处理10分钟。干燥后, 在加湿室中与放射性示踪剂一起在室温孵育30分钟。对于阻断研究, 使用10μM SAR127303或10μM PF-06809247。孵育后倒出切片, 并进行洗涤程序。将切片晾干, 然后将其附着至荧光成像板 (Fuji, Dielsdorf, Switzerland), 并持续曝光60分钟。随后使用BAS5000读取器 (Fuji) 扫描胶片, 并使用AIDA 4.50.010软件 (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, Germany) 进行数据分析。

[0114] 结果

[0115] [¹¹C]-I (约1nM) 与小鼠或大鼠的脑切片一起孵育会导致放射性信号积累的异质分布, 这与啮齿动物中的MAGL表达模式相匹配 (图1)。确切地说, 在皮层、海马体和纹状体中观察到[¹¹C]-I的最高积累, 其中报告了高水平的MAGL表达 (Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM 等人. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. Proc Natl Acad Sci. 2002; 99: 10819-10824)。两种不可逆且强效的MAGL抑制剂SAR127303和PF-06809247以10μM的浓度进行阻断, 以竞争与大鼠脑切片上的[¹¹C]-I的特异性结合。在两种情况下都观察到放射性的显著减少和均匀分布, 以及简单地将探针在MAGL KO脑切片上进行孵育。这些结果证实了[¹¹C]-I在体外的高特异性和选择性, 并表明体内脱靶结合的可能性降低。

[0116] 实例9-体内PET扫描

[0117] 使用异氟醚将动物麻醉并置于PET/CT扫描仪 (Super Argus, Sedecal, Madrid, Spain) 中。静脉注射放射性示踪剂, 并在注射后1分钟获取数据。[¹¹C]-I的动态PET扫描持续60分钟, 而[¹⁸F]-II和[¹⁸F]-III的动态PET扫描延长至90分钟。将所得的数据在用户定义的时间范围内重建, 其中体素大小为0.3875×0.3875×0.775mm³。目标区域 (ROI) 是在PMOD

v4.002 (PMOD Technologies, Zurich, Switzerland) 提供的MRI T2 (W. Schiffer) 模板上定义的,以生成对应的时间活性曲线 (TAC)。全脑和不同区域的放射性积累表示为标准化摄取值 (SUV),即根据所注入的放射性和体重归一化的衰变校正区域放射性。

[0118] 结果

[0119] 所有三种放射性示踪剂均能够穿过血脑屏障,并在小鼠的脑中5分钟内达到最高积累水平。MAGL KO和WT小鼠的脑中的 $[^{18}\text{F}]$ -II和 $[^{18}\text{F}]$ -III的代表性全脑TAC示出在图3中。与WT小鼠相比,在MAGL KO小鼠中,观察到脑的清除速度明显更快,表明它们在体内具有特异性和选择性结合。与 $[^{18}\text{F}]$ T-401 ($\text{SUV}_{\text{最大}}$ 约0.7,报道在Hattori Y, Aoyama K, Maeda J等人. Design, Synthesis, and Evaluation of (4R)-1-{3-[2-(^{18}F)Fluoro-4-methylpyridin-3-yl]phenyl}-4-[4-(1,3-thiazol-2-ylcarbonyl)piperazin-1-yl]pyrrolidin-2-one ($[^{18}\text{F}]$ T-401) as a Novel Positron-Emission Tomography Imaging Agent for Monoacylglycerol Lipase. J Med Chem. 2019;62:2362-2375中)相比, $[^{11}\text{C}]$ -I (1分钟p.i时 $\text{SUV}_{\text{最大}}$ 约1.32)、 $[^{18}\text{F}]$ -II (1分钟p.i时 $\text{SUV}_{\text{最大}}$ 约1.56)和 $[^{18}\text{F}]$ -III (1分钟p.i时 $\text{SUV}_{\text{最大}}$ 约1.63)实现了脑摄取的显著增加。探针在体内的异质分布与小鼠的脑中MAGL表达水平高度一致。与其体外放射自显影图非常相似的 $[^{11}\text{C}]$ -I的代表性PET图像,示出在图2中。

[0120] 实例10-药物占有率研究

[0121] 为了研究 $[^{18}\text{F}]$ -II的效用,在验证体外/体内特异性后进行了药物占有率研究。最初开发用于抗炎治疗的强效和选择性共价MAGL抑制剂PF-06795071应用于这项研究 (McAllister LA, Butler CR, Mente S等人. Discovery of Trifluoromethyl Glycol Carbamates as Potent and Selective Covalent Monoacylglycerol Lipase (MAGL) Inhibitors for Treatment of Neuroinflammation. J Med Chem. 2018;61:3008-3026)。PF-06795071在DMSO/Cremophor/盐水 (v/v/v=5/5/90) 的媒剂中制备为透明溶液。在施用 $[^{18}\text{F}]$ -II (4.15至11.13 MBq, 6.84至13.19 nmol/kg) 前1小时,用递增剂量的PF-06795071 (0.002、0.01、0.05、0.2和2 mg/kg) 处理动物。如实例9中所述进行体内PET扫描和数据重建。在受体占有率研究中,对全脑TAC的SUV在0至90分钟之间取平均值,以获得 $\text{SUV}_{0\text{至}90\text{分钟}}$,如Krämer等人之前详述的那样 (Krämer SD, Betzel T, Mu L等人. Evaluation of ^{11}C -Me-NB1 as a Potential PET Radioligand for Measuring GluN2B-Containing NMDA Receptors, Drug Occupancy, and Receptor Cross Talk. J Nucl Med. 2018;59:698-703)。使用GraphPad Prism软件 (版本8.3.4, GraphPad Software Inc) 拟合非线性曲线以获得 D_{50} 值。

[0122] 结果

[0123] 观察到小鼠的脑中的 $[^{18}\text{F}]$ -II积累的剂量依赖性减少,其中PF-06795071范围为0.002至2 mg/kg。然后将全脑TAC的平均 $\text{SUV}_{0\text{至}90\text{分钟}}$ 转换为靶标占有率百分比,并拟合到饱和方程中以确定药物-靶标接合 (图4)。PF-06795071在小鼠的脑中占有50% MAGL所需的剂量为0.034 mg/kg。这项研究证明了 $[^{18}\text{F}]$ -II作为可逆MAGL PET示踪剂的效用,其用于可视化体内药物-靶标接合,以及非侵入性地量化药物占有率。可逆MAGL PET示踪剂在啮齿动物中的靶标占有率是前所未有的。这些发现表明, $[^{18}\text{F}]$ -II是用于在体内非侵入性地可视化MAGL的非常有前途的PET探针,并具有巨大的临床转化潜力。

[0124] 实例11-与MAGL结合的化合物-II的X-射线结构

[0125] 将具有Lys36Ala、Leu169Ser和Leu176Ser突变的人MAGL蛋白浓缩至10.8mg/ml。结晶试验是在21℃的坐滴蒸气扩散装置中进行的。在0.1M MES pH 6.5、6%至13%PEG MME5K、12%异丙醇中,2天内出现晶体。将晶体在补充有10mM化合物II的结晶溶液中浸泡16小时。为了收集数据,将晶体在100K快速冷却,并在浸泡溶液中加入20%乙二醇作为冷冻保护剂。使用Eiger2X 16M检测器在瑞士光源(Villigen, Switzerland)的光束线X10SA上以0.9999 Å的波长收集X-射线衍射数据。数据已使用XDS (Kabsch W, XDS. Acta Cryst. D66, 125-132 (2010)) 处理,并使用SADABS (BRUKER) 进行缩放。晶体属于晶胞轴为 $a = 89.96 \text{ Å}$, $b = 127.45 \text{ Å}$, $c = 63.03 \text{ Å}$ 的空间群C22₁,并且衍射至1.65Å的分辨率。结构是使用PHASER通过分子置换(McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, & Read, R. J. Phaser crystallographic software. J Appl Cryst. 40, 658-674 (2007)),使用PDB条目3PE6的坐标为搜索模型(Schalk-Hihi C, Schubert C, Alexander R, Bayoumy S, Clemente JC, Deckman I, DesJarlais RL, Dzordzorme KC, Flores CM, Grasberger B, Kranz JK, Lewandowski F, Liu L, Ma H, Maguire D, Macielag MJ, McDonnell ME, Mezzasalma Haarlander T, Miller R, Milligan C, Reynolds C, Kuo LC. Crystal structure of a soluble form of human monoglyceride lipase in complex with an inhibitor at 1.35 Å resolution. Protein Sci. 20(4), 670-83 (2011)) 来确定的。

[0126] 结果

[0127] 人MAGL与化合物-II的复合结构证实了化合物II与酶的可逆结合机制(图5)。吡咯烷酮氧位于催化Ser122附近,并指向氧阴离子穴,与来自Met123和Ala51的主链主链酰胺形成氢键。

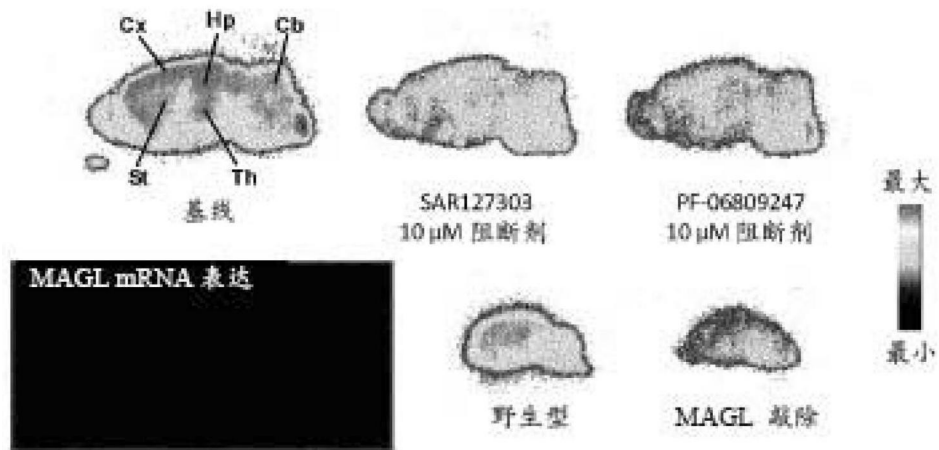


图1

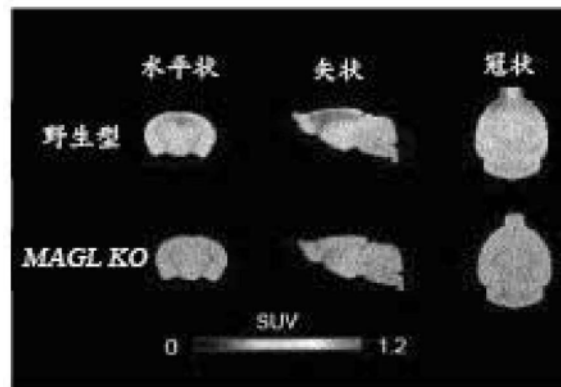


图2

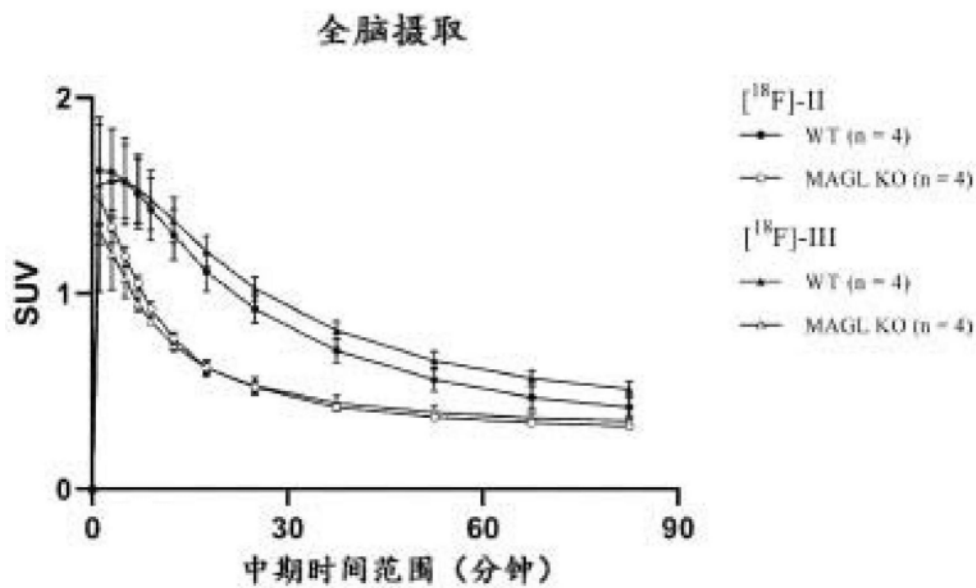


图3

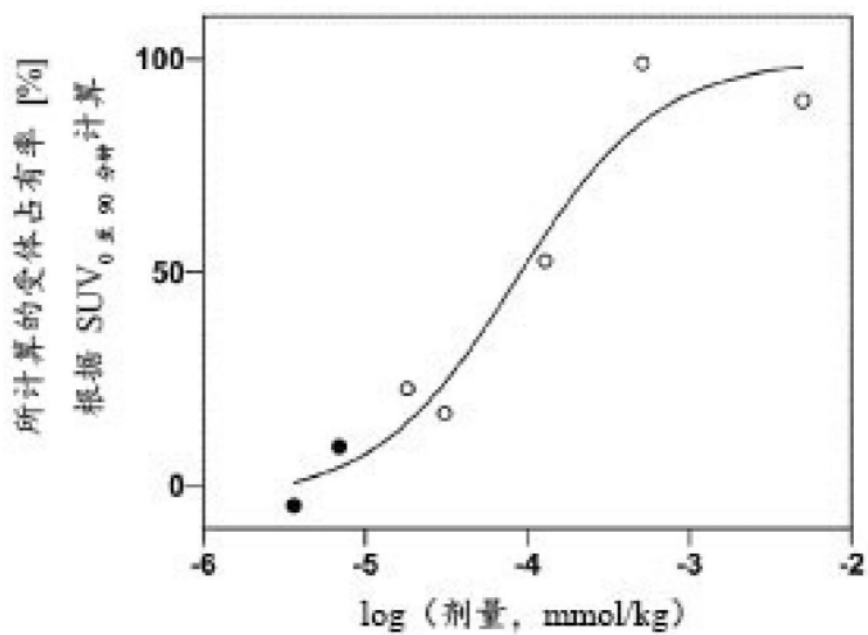


图4

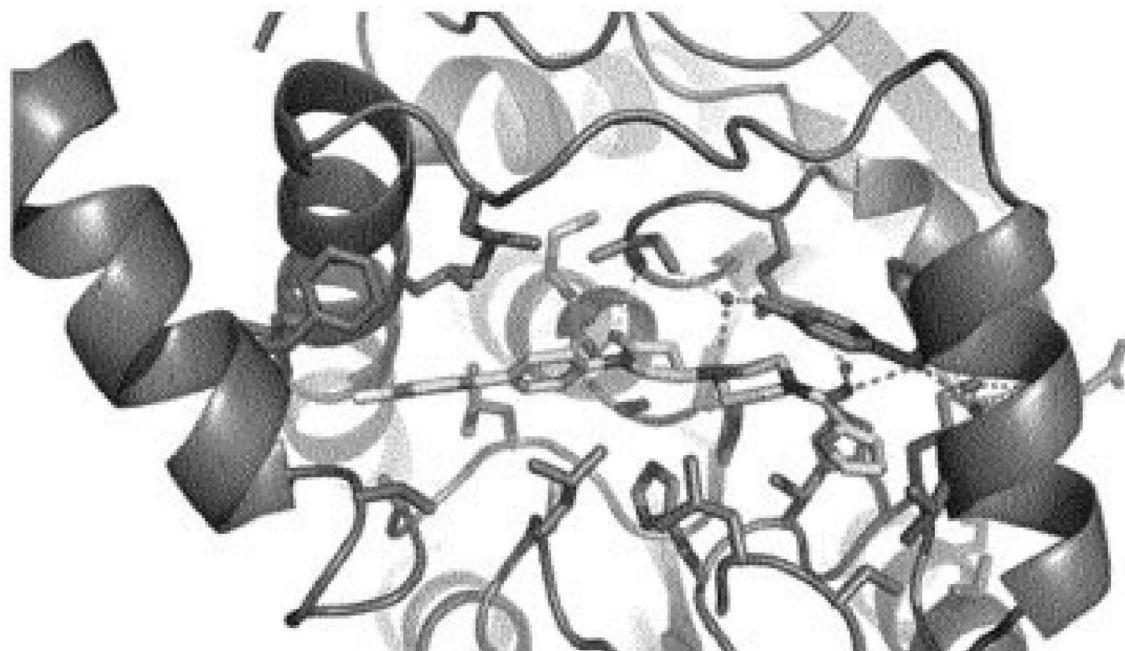


图5